Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

Ausscheidung von freiem und konjugierten Sulfat bei der Ratte und beim Menschen nach Verabreichung von N-Acetyl-p-aminophenol

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Norbert Texter

1968

Dekan: Prof. Dr. H. Witter

Referent: Prof. Dr. W. Rummel

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. W. Rummel

Ausscheidung von freiem und konjugierten Sulfat bei der Ratte und beim Menschen nach Verabreichung von N-Acetyl-p-aminophenol

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Norbert Texter

Dekan: Prof. Dr. H. Witter

Referent: Prof. Dr. W. Rummel

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am
19. Dezember 1968 abgelegt.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 259, 276—289 (1968)

Ausscheidung freien und konjugierten Sulfates bei Ratte und Menschen nach Verabreichung von N-Acetyl-p-Aminophenol* **

N. Texter

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. W. Rummel)

Eingegangen am 21. Juli 1967

* Herrn Prof. Dr. F. von Brücke zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Über einen Teil der Ergebnisse wurde auf der 7. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Mainz, 24.—27. April 1966, berichtet: Büch, H., Ch. Eschrich u. K. Pfleger: Zur Frage der Induzierbarkeit der Sulfurylierung des N-Acetyl-p-aminophenols (NAPAP). Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. **255**, 6 (1966).

Urinary Excretion of Free and Conjugated Sulfate Following Administration of N-acetyl-p-aminophenol in Rats and Men

Summary. In rats, urinary excretion of free sulfate decreases by 90% following the i.p. administration of 200 mg/kg N-acetyl-p-aminophenol (NAPAP). It seems that the conjugation with sulfuric acid as measured by the excretion of NAPAP-sulfate is limited by the amount of inorganic sulfate available. By addition of sodium sulfate or sodium thiosulfate, the sulfate conjugation can be increased by 100% and, consequently, the excretion of NAPAP is markedly enhanced. After administration of phenobarbital an increase in urinary excretion of NAPAP-sulfate due to induction can be observed if the concentration of sulfate is not limited.

In man, too, urinary excretion of free sulfate is diminished after administration of 2 g NAPAP; simultaneously, the excretion of physiological conjugates of sulfate is decreased.

Key-Words: N-acetyl-p-aminophenol — Sulfate Excretion — Sulfate Conjugation — Induction.

Zusammenfassung. Bei der *Ratte* nimmt nach i.p. Verabreichung von 200 mg/kg N-Acetyl-p-aminophenol (NAPAP) die Ausscheidung des *freien* Sulfates im Urin um ca. 90% des Kontrollwertes ab. Demnach ist die Konjugation mit Schwefelsäure bei der Ratte — gemessen an der Ausscheidung von NAPAP-sulfat — durch die verfügbare Menge an anorganischem Sulfat limitiert. Durch Zulage von Natriumsulfat bzw. Natriumthiosulfat wird die Sulfat-Konjugation bis zu 100% erhöht und damit die Elimination des NAPAP insgesamt beträchtlich gesteigert. Nach Phenobarbital-Vorbehandlung und gleichzeitiger Sulfatzulage tritt eine induktiv bedingte Mehrausscheidung an NAPAP-sulfat auf.

Auch beim *Menschen* wird nach Gabe von 2 g N-Acetyl-p-aminophenol bis zu 50% weniger freies Sulfat ausgeschieden. Außerdem wird nach dieser NAPAP-Dosis die Ausscheidung physiologischer Sulfat-Konjugate eingeschränkt.

Schlüsselwörter: N-Acetyl-p-aminophenol — Sulfatausscheidung — Sulfatkonjugation — Induktion.

Die Konjugation von Paracetamol (N-Acetyl-p-aminophenol; Abkürzung: NAPAP) mit Glucuronsäure nimmt bei der Ratte mit der NAPAP-Dosis zu und wird im Gegensatz zur Sulfat-Konjugation durch Vorbehandlung mit Phenobarbital bis zu 100% gesteigert (Büch et al., 1965, 1967a). Im Unterschied dazu steigt die Konjugation mit Schwefelsäure im Bereich der höheren NAPAP-Dosen nicht weiter an. Das steht im Einklang mit den Resultaten von Bray u. Mitarb. (1952a, 1952b) sowie von Williams (1959), die fanden, daß bei niedrigen Phenol-Dosen vorwiegend mit Schwefelsäure und bei höheren vorwiegend mit Glucuronsäure konjugiert wird.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Frage, ob und inwieweit die Konjugation des NAPAP mit Schwefelsäure durch das verfügbare anorganische Sulfat limitiert ist. Im einzelnen wurde deshalb folgendes geprüft: 1. ob die Ausscheidung von anorganischem Sulfat nach Belastung mit NAPAP abnimmt, 2. ob nach Zulage verschiedener Schwefelverbindungen die Ausscheidung an NAPAP-sulfat zunimmt und 3. ob unter dieser Bedingung dann auch nach Phenobarbital eine Aktivierung der Konjugation mit Schwefelsäure in Erscheinung tritt.

Methodik

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Als Versuchstiere wurden weibliche Wistar-Ratten (250—300 g) verwendet. Zur Gewinnung des Urins saßen die Ratten einzeln in kleinen Stoffwechselkäfigen; hierbei wurde der Urin vom Kot getrennt quantitativ aufgefangen. Der Urin wurde entweder sofort aufgearbeitet oder bis zur Analyse bei —5° C eingefroren.

Verabreicht wurden Paracetamol (N-Acetyl-p-aminophenol DAB 6, E. Merck), Natriumsulfat und Natriumthiosulfat p.A. (E. Merck) sowie Dimethylsulfoxyd (DMSO, C. Roth) und Luminal-Natrium (Farbenfabriken Bayer).

Für die Versuche an Ratten wurde das NAPAP im Mörser fein zerrieben und als Suspension (je nach Dosis 0,2—1,5%) in 0,9% NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Zur Stabilisierung wurden den Suspensionen 0,1% Traganth beigemischt. Luminal-Natrium wurde als 0,75% Lösung in 0,9% NaCl-Lösung ebenfalls i.p. gegeben. Na_2SO_4 und $Na_2S_2O_3$ wurden als Lösung (1 mol/l) kurze Zeit nach der NAPAP-Gabe in eine Schwanzvene injiziert. DMSO wurde in einer Konzentration von 2 mol/l 10 min vor der NAPAP-Gabe i.p. verabreicht. Cystein · HCl wurde als Lösung 1 mol/l unmittelbar vor der NAPAP-Gabe mit der Schlundsonde verabreicht.

Die Induktion mit Phenobarbital erfolgte durch Verabreichung von 75 mg/kg Luminal-Natrium an 4 aufeinander folgenden Tagen. Bis zum Versuchsbeginn bestand stets — von der letzten Luminal-Injektion an gerechnet — eine Pause von mindestens 48 Std.

Für die Versuche am Menschen hatten sich erwachsene gesunde Männer zur Verfügung gestellt. 2 g NAPAP wurden in Stärkekapseln am Vormittag nach dem Frühstück zusammen mit 300 ml Wasser eingenommen. Bei denselben Versuchspersonen wurde in Vorversuchen ohne Verabreichung von NAPAP zur selben Tageszeit die Sulfat-Ausscheidung gemessen.

2. Bestimmungsverfahren

a) Bestimmung von NAPAP, NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid

Diese Verfahren (dünnschichtchromatographische Auftrennung des Urins und spektralphotometrische Bestimmung der einzelnen Produkte) sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Büch et al., 1967b).

b) Bestimmung des freien anorganischen Sulfates im Harn

Eine von Wainer u. Koch (1962) angegebene Methode wurde so modifiziert, daß sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen das freie Sulfat im Harn bestimmt werden konnte. Das Prinzip dieser Sulfat-Bestimmungsmethode wurde erstmals von Bertolacini u. Barney (1957) bschrieben.

Reagentien. Na_2SO_4, Methanol und 97% Essigsäure p.A. (E. Merck). Dowex®, Ionenaustauscher-Harz, Typ 50 WX 4, p.A. und Bariumchloranilat p.A. (Serva). 0,1 M Acetatpuffer (pH 4,65).

Vorgehen. 2—4 ml Urin werden in 1 g Dowex suspendiert. Nach 3 min wird der Kationenaustauscher durch Filtration wieder von dem Urin abgetrennt. Von diesem sauren Urin werden 0,5 ml in ein 25 ml fassendes Erlenmeyer-Kölbchen zusammen mit 0,5 ml Aqua bidest. gegeben. Nach Zugabe von 1,0 ml Acetatpuffer, 2,0 ml Methanol und 30 mg Bariumchloranilat wird das Gefäß verschlossen und 10 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der Ansatz wird anschließend in ein kleines Zentrifugenröhrchen übergeführt und scharf zentrifugiert. Von dem violett gefärbten Überstand werden 2,0 ml in ein anderes Röhrchen übergeführt und nach Zugabe von 0,1 ml Eisessig kurz umgeschüttelt. Im Photometer Eppendorf wird dann gegen einen analog hergestellten Leerwert (Wasser anstelle von Urin) bei 546 mμ (Schichtdicke = 1 cm) die Extinktion gemessen.

c) Bestimmung des anorganischen Gesamtsulfates im Harn

Von dem sauren Harn (nach Kontakt mit dem Ionenaustauscher) werden 2—3 ml in einem verschlossenen Reagensglas bei 100° C 4 Std hydrolysiert. Das Urin-Hydrolysat wird erneut über den Ionenaustauscher gegeben. Danach werden 0,5 ml in der beschriebenen Weise (Abschnitt b) aufgearbeitet.

Aus der Differenz von freiem und Gesamtsulfat ergibt sich die Menge an *konjugiertem* Sulfat im Harn.

Ergebnisse

1. Die Ausscheidung von freiem und gebundenem Sulfat bei der Ratte nach Verabreichung von NAPAP

Nach i.p. Verabreichung von 200 mg/kg NAPAP wurde die Ausscheidung des *freien* Sulfates und des *Gesamt*-Sulfates für den Zeitraum von 8 Std gemessen. Die Kontrolltiere erhielten anstelle der NAPAP-Suspension das gleiche Volumen 0,9% NaCl-Lösung i.p. Es zeigt sich (Abb. 1), daß in dem Zeitraum 0—4 Std nach der Injektion bei den Kontrollen in einem Harnvolumen von 6,0 ml rund 62 μM *freies* Sulfat ausgeschieden wurden. Die Bestimmung des Gesamtsulfates ergab im Mittel 63 μM, d. h. die Menge unterschied sich nicht von der des freien Sulfates. Unter dieser Bedingung wurde also organisches Sulfat nicht in Mengen ausgeschieden, die mit der angewendeten Methode hätten erfaßt werden können.

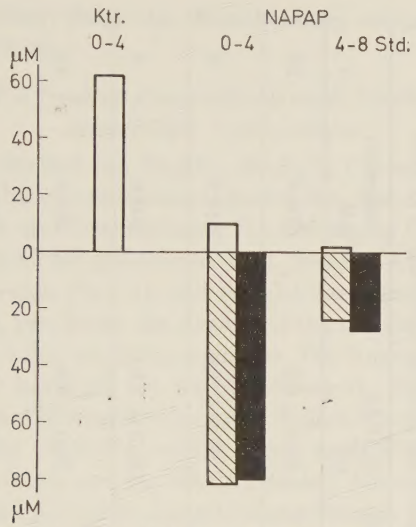

Abb. 1. Freies und konjugiertes Sulfat sowie Ausscheidung des NAPAP-sulfates im Harn nach 200 mg/kg NAPAP bei der Ratte. ▫ freies Sulfat; ▪ Anteil des NAPAP-sulfates am konjugierten Sulfat; ▨ konjugiertes Sulfat

Kontrollen (= Ktr.) i.p. 3,0 ml 0,9% NaCl

0—4 Stunden: $n = 12$
Harnvolumen $= 6{,}0 \pm 2{,}0$ ml
σ freies Sulfat $= \pm 15{,}9$ µM
konj. Sulfat mit der Bestimmungsmethode nicht erfaßbar.

NAPAP 200 mg/kg in 3,0 ml 0,9% NaCl i.p.

0—4 Stunden: $n = 15$
Harnvolumen $= 5{,}5 \pm 2{,}6$ ml
σ freies Sulfat $= \pm 7{,}6$ µM, gegen Ktr. $p < 0{,}001$.
σ konj. Sulfat $= \pm 18{,}2$ µM

4—8 Stunden: $n = 4$
Harnvolumen $= 3{,}6 \pm 1{,}2$ ml
σ freies Sulfat $= \pm 0{,}9$ µM, gegen Ktr. $p < 0{,}001$
σ konj. Sulfat $= \pm 8{,}6$ µM

Nach Verabreichung von NAPAP ändern sich die Ausscheidungsverhältnisse. Bei etwa gleichem Harnvolumen (5,5 ml) wurden im Zeitraum von 0—4 Std nach der Injektion nur noch 10 µM *freies* Sulfat ausgeschieden. Demgegenüber beträgt die Ausscheidung des Gesamtsulfates 92 µM, d. h. rund 82 µM werden nun in *konjugierter* Form ausgeschieden. Im Zeitraum 4—8 Std wurden folgende Mittelwerte erhalten: Harnvolumen 3,6 ml, *freies* Sulfat 2 µM, Gesamtsulfat 26 µM, d. h. *konjugiertes* Sulfat 24 µM.

Das Ergebnis besagt also, daß bei der Ratte nach Gabe von NAPAP die Ausscheidung an *freiem* Sulfat auf 5—15% des Kontrollwertes ab-

Tabelle 1. *Ausscheidungsverhältnisse nach i.p. Gabe von 200 mg/kg NAPAP und Verabreichung von Na_2SO_4, $Na_2S_2O_3$, DMSO bzw. Cystein · HCl im Zeitraum von 0—4 Std bei der Ratte. * Unterschied gegenüber den Kontrollen gesichert: $p < 0{,}005$*

ätzlich	Harnvolumen ml	NAPAP-sulfat µM	NAPAP-glucuronid µM	NAPAP µM	insgesamt µM	*n*
(Kontr.)	3,7 ± 1,4	80,3 ± 7,2	97,5 ± 19,9	30,8 ± 6,2	208,6	18
M Na_2SO_4	3,5 ± 1,0	142,6 ± 32,0*	73,6 ± 13,1	27,0 ± 7,8	243,2	8
M $Na_2S_2O_3$	4,1 ± 0,7	166,0 ± 21,3*	113,3 ± 15,1	25,3 ± 3,9	304,6	4
M DMSO	4,8 ± 1,6	103,0 ± 16,8*	77,4 ± 12,0	28,0 ± 8,8	208,4	10
M Cystein · HCl	1,1 ± 0,1	98,8 ± 12,7*	90,0 ± 3,4	7,3 ± 3,7	196,1	4

sinkt. Demgegenüber steigt die Ausscheidung an gebundenem Sulfat entsprechend stark an.

2. NAPAP-sulfat-Ausscheidung nach Verabreichung schwefeliger Verbindungen

Es wurde der Einfluß von Na_2SO_4, $Na_2S_2O_3$, Cystein · HCl und DMSO auf die Ausscheidungsverhältnisse untersucht. Im Zeitraum von 0—4 und 4—8 Std nach der Verabreichung von 200 mg/kg NAPAP i.p. wurden NAPAP-sulfat, NAPAP-glucuronid und freies NAPAP im Harn bestimmt. Es zeigte sich (Tab. 1), daß bei gleichzeitiger i.v. Verabreichung von 1 mM Na_2SO_4 pro Ratte die Ausscheidung des Sulfat-Konjugates im Zeitraum von 0—4 Std um 80% zunimmt. Die Ausscheidung des Glucuronid-Konjugates hingegen ist leicht verringert. Nach i.v. Gabe von 1 mM $Na_2S_2O_3$ ist die Ausscheidung des Sulfat-Konjugates im gleichen Zeitraum um mehr als 100% erhöht. Auch nach DMSO (i.p. Gabe von 4 mM pro Ratte 10 min vor der NAPAP-Gabe) läßt sich eine signifikante Steigerung der NAPAP-sulfat-Ausscheidung erzielen (ca. 30%). Cystein · HCl (2 mM oral) steigert die NAPAP-sulfat-Ausscheidung ebenfalls.

Tabelle 2. *NAPAP-sulfat-Ausscheidung (µM) im Harn unter steigender NAPAP-Dosis und gleichbleibendem Na_2SO_4-Angebot im Zeitraum von 0—4 Std bei Ratten. Unterschied zwischen * signifikant mit p-Wert < 0,05*

i.p. NAPAP mg/kg	Kontrollen µM	zusätzlich i.v. 1 mM Na_2SO_4 µM	Steigerung der NAPAP-sulfat-ausscheidung %
75	47,8 ± 12,3 $n = 10$	91,6 ± 19,2 $n = 5$ $p < 0{,}001$	92
200	80,3 ± 7,2 $n = 18$	142,6 ± 32,0* $n = 8$ $p < 0{,}001$	78
300	99,2 ± 20,0 $n = 12$	129,0 ± 24,5 $n = 10$ $p < 0{,}025$	30
600	85,1 ± 35,6 $n = 10$	110,1 ± 38,2* $n = 8$	29

3. Mehrausscheidung an NAPAP-sulfat in Abhängigkeit von der NAPAP-Dosis bei konstantem Sulfat-Angebot

Bei gleichbleibendem Angebot von Na_2SO_4 (i.v. 1 mM/Tier) wurde die NAPAP-sulfat-Ausscheidung nach 75, 300 und 600 mg/kg NAPAP untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 2 wiedergegeben. Die durch die Na_2SO_4-Gabe verursachte Zunahme der NAPAP-sulfat-Ausscheidung

ist bei der niedrigsten NAPAP-Dosis prozentual am stärksten. Das Maximum der absolut ausgeschiedenen Menge an NAPAP-sulfat wird wie bei der Gruppe, die kein zusätzliches Sulfat erhielt, im Dosisbereich um 200 mg/kg erreicht.

4. Der Einfluß einer Vorbehandlung mit Phenobarbital auf die NAPAP-sulfat-Ausscheidung bei Verabreichung von Sulfat

Im Gegensatz zur Glucuronid-Konjugation kann die Konjugation des NAPAP mit Schwefelsäure durch Vorbehandlung mit Phenobarbital weder nach niedriger (150 mg/kg) noch nach höherer (600 mg/kg) NAPAP-Dosis gesteigert werden (Büch et al., 1965; 1967a). Es sollte mit Hilfe von Sulfatgaben geprüft werden, ob dieser Unterschied zwischen den Konjugationsmechanismen vielleicht lediglich darauf zurückzuführen ist, daß infolge eines Mangels an Sulfat ein tatsächlich vorhandener induktiver Effekt nicht in Erscheinung treten kann.

In Tab.3 ist die Auswirkung der Induktion auf die Konjugation von NAPAP (300 mg/kg i.p.) bei zusätzlicher i.v. Sulfatgabe (1 mM/Tier) wiedergegeben. Unter dieser Bedingung wurde nun auch die induktive Wirkung des Phenobarbitals auf die Schwefelsäure-Konjugation sichtbar. Die Ausscheidung von NAPAP-sulfat nahm um 40% zu. Gleichzeitig steigt die Ausscheidung an NAPAP-glucuronid um ca. 70% an. Das hat bei verringerter Ausscheidung an nichtkonjugiertem NAPAP eine Steigerung der Gesamtausscheidung um 45% zur Folge.

Der Einfluß der Induktion auf die Relation der Ausscheidungsprodukte wird bei höherer NAPAP-Dosierung (600 mg/kg) noch deutlicher (Tab.4 bzw. Abb.2). Die Sulfat-Zulage verursacht bei nichtinduzierten Tieren (B) eine Steigerung der Ausscheidung an NAPAP-sulfat um 30%. Die Ausscheidung an NAPAP-glucuronid geht um 30% zurück. Die Induktion hat ohne Sulfat-Zulage (C) nur eine Mehrausscheidung an NAPAP-glucuronid (gegenüber A) um ca. 60% zur Folge. Erst nach Verabfolgung von Sulfat kann bei induzierten Ratten (D) neben der gesteigerten Glucuronid-Ausscheidung auch eine um 60% erhöhte Ausscheidung an NAPAP-sulfat (gegenüber B) erzielt werden. Unter dieser Bedingung nimmt dann auch die Gesamtausscheidung als Folge der Sulfatzulage zu.

5. Sulfat-Ausscheidung nach Verabfolgung von NAPAP beim Menschen

Nach Gabe von 2 g NAPAP (oral) wurde bei gesunden Erwachsenen die Ausscheidung von freiem und gebundenem Sulfat sowie von NAPAP-sulfat und NAPAP-glucuronid gemessen. In Vorversuchen wurde bei den gleichen Personen zur Gewinnung von Normalwerten die Sulfat-Ausscheidung bestimmt. Die Versuche wurden stets zur selben Tages-

Tabelle 3. *Beeinflussung der Ausscheidung von NAPAP (300 mg/kg) nach Gabe von Na_2SO_4 und zusätzlicher Induktion mit Phenobarbital bei der Ratte. Induktion: an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 75 mg/kg Phenobarbital i.p.; mindestens 48 Std Pause bis zur NAPAP-Gabe*

induziert	1 mM Na_2SO_4 i.v.	Harnvolumen ml	NAPAP-sulfat µM	NAPAP-glucuronid µM	NAPAP µM	insgesamt µM	*n*
−	+	3,1 ± 2,1	129,0 ± 24,5	132,4 ± 30,2	36,0 ± 6,1	297	10
+	+	4,9 ± 1,5	189,7 ± 31,9[a]	220,6 ± 37,9[a]	24,5 ± 9,4	435	10

[a] Unterschied gegenüber den nicht induzierten Ratten gesichert: $p < 0{,}01$.

Tabelle 4. *Beeinflussung der Ausscheidung von NAPAP (600 mg/kg) nach Gabe von Na_2SO_4 und zusätzlicher Induktion mit Phenobarbital bei der Ratte. Induktion siehe Tab. 3. p-Werte: NAPAP-sulfat, D gegenüber C, B und A: $p < 0{,}01$; NAPAP-glucuronid: B gegenüber A $p < 0{,}05$; C gegenüber A: $p < 0{,}01$*

induziert	1 mM Na_2SO_4 i.v.	Harnvolumen ml	NAPAP-sulfat µM	NAPAP-glucuronid µM	NAPAP µM	insgesamt µM	*n*
A −	−	5,3 ± 1,8	85,1 ± 35,6	180,4 ± 41,6	113,5 ± 33,1	379	10
B −	+	3,7 ± 1,3	110,1 ± 38,2	117,8 ± 46,5	89,0 ± 33,0	317	8
C +	−	5,0 ± 2,2	67,7 ± 23,3	279,1 ± 45,1	100,1 ± 25,2	447	8
D +	+	4,1 ± 1,0	180,3 ± 49,6	255,1 ± 69,3	80,2 ± 20,5	516	10

zeit vorgenommen. Zusammen mit dem NAPAP wurden 300 ml Wasser eingenommen. Die Messungen ergaben (Abb. 3), daß beim Menschen in einem Zeitraum von 4 Std im Mittel ca. 4,2 mM freies Sulfat und ca. 1 mM gebundenes Sulfat in einem Harnvolumen von ca. 350 ml zur Ausscheidung gelangen. Demnach scheidet der Mensch innerhalb von 4 Std ca 50 μM, die Ratte hingegen ca. 200 μM freies Sulfat pro kg Körpergewicht aus.

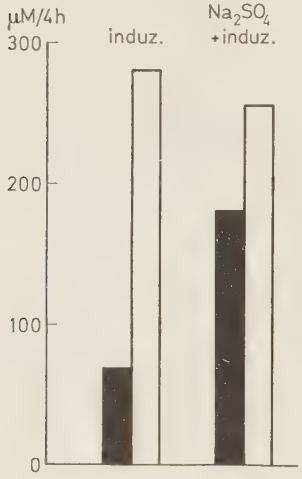

Abb. 2

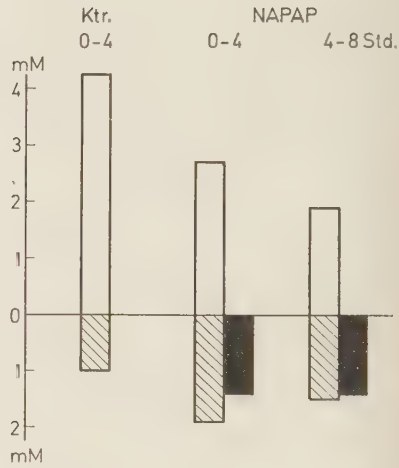

Abb. 3

Abb. 2. Ausscheidung der NAPAP-Konjugate bei induzierten Ratten nach 600 mg/kg NAPAP i.p. mit und ohne Sulfat-Zulage. ▪ NAPAP-sulfat; ▫ NAPAP-glucuronid (Statistik siehe Tab. 4)

Abb. 3. Freies und konjugiertes Sulfat sowie Ausscheidung des NAPAP-sulfates im Harn beim Menschen. ▫ freies Sulfat; ▪ Anteil des NAPAP-sulfates am konjugierten Sulfat; ▨ konjugiertes Sulfat

Kontrollen (= Ktr.) erhielten 300 ml H_2O

0—4 Stunden: $n = 14$

Harnvolumen = 350 ± 90 ml
σ freies Sulfat = ± 0,67 mM
σ konj. Sulfat = ± 0,52 mM

NAPAP 2 g = 13,25 mM oral und 300 ml H_2O

0—4 Stunden: $n = 12$

Harnvolumen = 240 ± 70 ml
σ freies Sulfat = ± 1,35 mM, gegen Ktr. $p < 0{,}025$
σ konj. Sulfat = ± 0,77 mM, gegen Ktr. $p < 0{,}025$
σ NAPAP-sulfat = ± 0,44 mM

4—8 Stunden: $n = 12$

Harnvolumen = 190 ± 50 ml
σ freies Sulfat = ± 1.02 mM, gegen Ktr. $p < 0{,}025$
σ konj. Sulfat = ± 0,89 mM
σ NAPAP-sulfat = ± 0,57 mM

Nach Einnahme von NAPAP ändern sich die Ausscheidungsverhältnisse beim Menschen folgendermaßen: Während das freie Sulfat im Zeitraum von 0—4 Std um rund 35% und im Zeitraum von 4—8 Std um rund 50% abnimmt, steigt die Menge an gebundenem Sulfat von 0—4 Std um 85% und von 4—8 Std um 50% gegenüber dem Kontrollwert an. Beim Vergleich der verabreichten NAPAP-Dosen (200 mg/kg bei der Ratte und ca. 25 mg/kg beim Menschen) wird verständlich, weshalb sich bei der Ratte ein Sulfatmangel deutlicher bemerkbar macht, so sehr, daß fast kein anorganisches Sulfat mehr ausgeschieden wird.

Die Bestimmung der NAPAP-Konjugate ergibt, daß um das Doppelte mehr NAPAP-glucuronid (0—4 Std = 2,56 ± 0,97 mM, 4—8 Std = 3,41 ± 1,26 mM) als NAPAP-sulfat ausgeschieden wird. Zieht man wieder das Ergebnis der an Ratten durchgeführten Versuche zum Vergleich heran, dann muß festgestellt werden, daß beim Menschen nach einer Dosis von 2 g, das sind 25 mg/kg, die Konjugation mit Glucuronsäure bereits überwiegt. Von den verabreichten 13 mM NAPAP werden in 8 Std insgesamt rund 65% als Konjugate mit dem Harn abgegeben. Dabei beträgt die ausgeschiedene Menge an NAPAP-sulfat weniger als die Hälfte derjenigen des NAPAP-glucuronids.

Setzt man die Menge an konjugiertem Sulfat in Vergleich zu der an NAPAP-sulfat, so zeigt sich, daß im Zeitraum von 0—4 Std NAPAP-sulfat über 70% der insgesamt ausgeschiedenen Menge an Schwefelsäure-Konjugaten ausmacht. Im Zeitraum von 4—8 Std ist die Menge an ausgeschiedenem NAPAP-sulfat praktisch identisch mit derjenigen an konjugiertem Sulfat. Dies bedeutet, daß die sonst für die Ausscheidung physiologischer Sulfat-Konjugate beanspruchte Menge an Sulfat in diesem Zeitraum zur Konjugation von NAPAP verwendet wird.

Diskussion

Die Konjugation mit Schwefelsäure spielt bei der Entgiftung und Ausscheidung einer Reihe von Stoffen im Organismus neben der Bildung von Glucuronsäurekonjugaten eine große Rolle. Nicht nur physiologische Substrate wie z. B. Steroide (Schachter u. Marrian, 1938; Klyne et al., 1948; Venning et al., 1942; Roy, 1956; Schneider u. Lewbart, 1956; De Meio et al., 1958), Katecholamine (Boström u. Vestermark, 1961; Boström, 1965), Serotonin (Davis et al., 1965, 1966), Bilirubin (Isselbacher u. McCarthy, 1959; Schoenfield et al., 1962) und Darmfäulnisprodukte (Indol, Phenol und Kresol) (Boström u. Vestermark, 1961; Boström, 1961, 1965) werden mit Schwefelsäure konjugiert und in dieser Form möglicherweise im Harn ausgeschieden, sondern auch viele Fremdstoffe und Arzneimittel, vor allem solche mit phenolischen OH-Gruppen wie z. B. diejenigen Analgetica, die Abkömmlinge des p-Aminophenols sind (Brodie u. Axelrod, 1949; Smith u. Williams,

1949), ferner Phenobarbital (Butler, 1956), Chloramphenicol (Goldberg, 1960) und Äthanol (Boström u. Vestermark, 1961; Boström, 1961).

Die Konjugation geeigneter Substrate mit Schwefelsäure setzt die Bildung von aktivem Sulfat sowie das Vorhandensein von Sulfokinasen voraus (De Meio et al., 1953; Robbins u. Lipman, 1957, 1958a, 1958b; Lipman, 1958; Roy, 1958; 1960; Boyland et al., 1957; Gregory u. Lipman, 1957). Da aus der Nahrung nur wenig anorganisches Sulfat resorbiert wird, muß das für die Konjugation verwendete Sulfat größtenteils endogen erst durch Oxydation organischen Schwefels gebildet werden. Die Quelle hierfür stellen S-haltige Aminosäuren wie Methionin, Cystein und Cystin dar (Literatur-Übersicht bei Young u. Maw, 1958; Sabry et al., 1965). Soweit die dabei gewonnene Schwefelsäure nicht für die physiologischen Konjugationen verbraucht wird, erscheint sie dann als anorganisches Sulfat im Harn.

Durch Verabreichung von N-Acetyl-p-aminophenol, einem typischen Sulfat-Acceptor, wurde das sulfatkonjugierende System belastet. Es ergab sich, daß nur bis 150 mg/kg (i.p. an 250—300 g schwere weibliche Wistar-Ratten verabreicht) die Ausscheidung an NAPAP-sulfat ansteigt (Büch et al., 1967a). Da nach 200 mg/kg NAPAP die Ausscheidung des freien Sulfates im Urin bereits auf 5—15% des Kontrollwertes abgesunken war, mußte angenommen werden, daß die Menge an NAPAP-sulfat oberhalb dieser Dosis deshalb nicht weiter zunimmt, weil es dem konjugierenden System an anorganischem Sulfat mangelt. Wie demnach zu fordern, stieg bei erhöhtem Angebot von Sulfat die Konjugationsrate beträchtlich an. Bemerkenswert ist, daß die NAPAP-Dosis, bei der Sättigung des für die Konjugation mit Schwefelsäure verantwortlichen Systems erreicht ist, auch bei erhöhtem Sulfat-Angebot bei 200 mg/kg liegt. Bei noch höheren NAPAP-Dosen tritt in diesem Fall die bereits bei den Versuchen ohne Sulfatzulage erkennbare Verminderung der ausgeschiedenen NAPAP-sulfat-Mengen (Büch et al., 1967a) deutlich in Erscheinung. Hierin unterscheidet sich die Sulfatkonjugation von der Konjugation mit Glucuronsäure. Hierfür können zwei Ursachen diskutiert werden: entweder eine Substrathemmung bei dem für die Sulfatkonjugation verantwortlichen System oder, mit mehr Wahrscheinlichkeit, die Auswirkung einer Konkurrenz des für die Glucuronidkonjugation verantwortlichen Systems infolge eines höheren K_m-Wertes.

Zur Konjugation kann sowohl aus Natriumsulfat als auch aus Natriumthiosulfat entstandene Schwefelsäure Verwendung finden. Das ist schon länger bekannt (Laidlaw u. Young, 1948; Dziewiatkowski, 1949; Bray et al., 1952b). Die Zunahme der Konjugation nach Thiosulfat war bei unseren Versuchen am stärksten. Auch nach Gabe von DMSO war die Ausscheidung von NAPAP-sulfat erhöht, wenngleich der Effekt

wesentlich schwächer war. Wahrscheinlich deshalb, weil die metabolischen Schritte, die zur Bildung von Schwefelsäure aus DMSO führen, nicht schnell genug ablaufen.

Der Mangel an Sulfat für die Konjugation tritt dann noch deutlicher in Erscheinung, wenn infolge der Aktivierung der Konjugation nach Phenobarbital ein besonders großer Bedarf an Sulfat besteht. Die Erhöhung des Sulfatangebots hat hier deshalb auch mit über 150% die höchste Zunahme der NAPAP-sulfat-Ausscheidung zur Folge.

Auch beim Menschen nimmt nach Gabe einer hohen NAPAP-Dosis die Ausscheidung von freiem Sulfat im Harn ab. Gleichzeitig nimmt die Menge des konjugierten Sulfates zu. In der zweiten Vierstundenperiode besteht die Gesamtmenge des organischen Sulfates aus NAPAP-sulfat, d. h. daß unter diesen Bedingungen die physiologischerweise als Schwefelsäureester ausgeschiedenen Phenole nicht mehr mit Schwefelsäure konjugiert werden. Welche physiologischen Substrate dabei zu kurz kommen, darüber können aufgrund des normalen Ausscheidungsspektrums nur Vermutungen angestellt werden. Inwieweit diese Produkte ersatzweise anderweitig z. B. mit Glucuronsäure konjugiert werden, kann ohne weitere Untersuchungen nicht beantwortet werden. Man darf erwarten, daß sich auch beim Menschen durch Sulfat-Zulage, z. B. durch Thiosulfat, die metabolische Elimination von Pharmaka und Giften, die als Sulfat-Acceptoren in Frage kommen, beschleunigen läßt.

Literatur

Bertolacini, R. J., and J. E. Barney II: Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate. Analyt. Chem. **29**, 281 (1957).

Boström, H., Sulfate conjugation — Discussion —. In: Metabolic factors controlling duration of drug action. Proceedings of the first Int. Pharmac. Meet., Vol. 6, s.p. 58—64, Stockholm 1961 (Eds. B. B. Brodie and E. G. Erdös). Oxford: Pergamon Press 1961.

— Sulfate conjugation and conjugated sulfates. Scand. J. clin. Lab. Invest. Supp. **86**, 33 (1965).

—, and A. Vestermark: Some aspects on the sulphate conjugation. Biochem. Pharmacol. **6**, 72 (1961).

Boyland, E., D. Manson, and S. F. D. Ohr: The biochemistry of aromatic amines: 2. The conversion of arylamines into arylsulphamic acids and arylamine-N-glucosiduronic acids. Biochem. J. **65**, 417 (1957).

Bray, H. G., B. G. Humphris, W. V. Thorpe, K. Withe, and P. W. Wood: Kinetic studies of the metabolism of foreign organic compounds. 3. The conjugation of phenols with glucuronid acid. Biochem. J. **52**, 416 (1952a).

— — — — — Kinetic studies of the metabolism of foreign compounds. 4. The conjugation of phenols with sulphuric acid. Biochem. J. **52**, 419 (1952b).

Brodie, B. B., and J. Axelrod: The fate of acetophenetidin (Phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material. J. Pharmacol. exp. Ther. **97**, 58 (1949).

Büch, H., Ch. Eschrich u. K. Pfleger: Zur Frage der Induzierbarkeit der Sulfurylierung des N-Acetyl-p-aminophenols (NAPAP). Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. **255**, 6 (1966).

— W. Gerhards, K. Pfleger, W. Rüdiger u. W. Rummel: Metabolische Umwandlung von Phenacetin und N-Acetyl-p-aminophenol nach Vorbehandlung mit Phenobarbital. Biochem. Pharmacol. **16**, 1585 (1967a).

— G. Karachristianidis u. W. Rüdiger: Beeinflußung der metabolischen Umwandlung von Phenacetin und N-Acetyl-p-aminophenol (NAPAP) durch Barbiturate. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **251**, 107 (1965).

— K. Pfleger u. W. Rüdiger: Nachweis und Bestimmung von Phenacetin, N-Acetyl-*p*-aminophenol sowie ihren Hauptumwandlungsprodukten in Harn und Serum. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. **5**, 110 (1967b).

Butler, T. C.: The metabolic hydroxylation of phenobarbital. J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 326 (1956).

Davis, V. E., J. A. Huff, and H. Brown: Free and conjugated serotonin excretion in carocinid syndrome. J. Lab. clin. Med. **66**, 390 (1965).

— — — Isolation of serotonin-o-sulfate from human urine. Clin. chim. Acta **13**, 380 (1966).

De Meio, R. H., C. Lewycka, M. Wizerkaniuk, and O. Salciunas: Biological synthesis of sulphuric acid esters of steroid hormones and their metabolites. Biochem. J. **68**, 1 (1958).

— M. Wizerkaniuk, and E. Fabiani: Role of adenosinetriphosphate in the enzymatic synthesis of phenyl sulfate. J. biol. Chem. **203**, 257 (1953).

Dziewiatkowski, D. D.: On the utilization of exogenous sulfate sulphur by the rat in the formation of ethereal sulfates as indicated by the use of sodium sulfate labeled with radioactive sulfur. J. biol. Chem. **178**, 389 (1949).

Goldberg, J. H.: zit. nach J. D. Gregory: Sulfate conjugation. In: Metabolic factors controlling duration of drug action. Proceedings of the first Int. Pharmac. Meet., Vol. 6, s.p. 56, Stockholm 1961 (Eds. B. B. Brodie and E. G. Erdös). Oxford: Pergamon Press.

Gregory, J. D., and F. Lipmann: The transfer of sulfate among phenolic compound with 3′,5′-diphosphoadenosine as coenzyme. J. biol. Chem. **229**, 1081 (1957).

Isselbacher, K. J., and E. McCarthy: Studies on bilirubin sulfate and other nonglucuronide conjugates of bilirubin. J. clin. Invest. **38**, 645 (1959).

Klyne, W. B., B. Schachter, and G. F. Marrian: The steroids of pregnant mares' urine. Biochem. J. **43**, 231 (1948).

Laidlaw, J. C., and L. Young: Studies on the synthesis of ethereal sulphates in vivo. Biochem. J. **42**, Proc. 1 (1948).

Lipman, F.: Biological sulfate activation and transfer. Science **128**, 575 (1958).

Robbins, P. W., and F. Lipmann: Isolation and identification of active sulfate. J. biol. Chem. **229**, 837 (1957).

— — Separation of the two enzymatic phases in active sulfate synthesis. J. biol. Chem. **233**, 681 (1958a).

— — Enzymatic synthesis of adenosine-5′-phospho-sulfate. J. biol. Chem. **233**, 686 (1958b).

Roy, A. B.: The enzymatic synthesis of steroid sulphates. Biochem. J. **63**, 294 (1956).

— The enzymatic synthesis of aryl sulphamates. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **30**, 193 (1958).

— The enzymatic synthesis of aryl sulphamates. Biochem. J. **74**, 49 (1960).

Sabry, Z. I., S. B. Shadarevian, J. W. Cowan, and J. A. Campbell: Relationship of dietary intake of sulphur aminoacids to urinary excretion of inorganic sulphate in man. Nature (Lond.) **206**, 931 (1965).

Schachter, B., and G. F. Marrian: The isolation of estrone sulfate from the urine of pregnant mares. J. biol. Chem. **126**, 663 (1938).

Schneider, J. J., and M. L. Lewbart: Enzymatic synthesis of steroidssulfates. J. biol. Chem. **222**, 787 (1956).

Schoenfield, L. J., J. L. Bollmann, and H. N. Hoffman: Sulfate and glucuronide conjugates of bilirubin in experimental liver injury. J. clin. Invest. **41**, 133 (1962).

Smith, J. N., and R. T. Williams: Studies in detoxication: The metabolism of phenacetin (p-Ethoxy-acetanilide) in the rabbit and a further observation on acetanilide metabolism. Biochem. J. **44**, 239 (1949).

Venning, E. H., M. M. Hoffman, and J. S. L. Browne: Isolation of androsterone sulfate. J. biol. Chem. **146**, 369 (1942).

Wainer, A., and A. L. Koch: Determination of inorganic sulfate in urine using barium chloranilate. Analyt. Biochem. **3**, 457 (1962).

Williams, R. T.: Detoxication mechanisms, p. 279. London: Chapman & Hall Ltd. 1959.

Young, L., and G. A. Maw: The metabolism of sulphur compounds. London: Methuen and Co. Ltd. 1958.

Die Arbeit erschien unter den Namen H. Büch, W. Rummel, K. Pfleger, Ch. Eschrich u. N. Texter in Naunyn-Schmiedebergs Arch. f. Pharmak. exp. Path., Bd. 259, S. 276—289 (1968).

Herrn Prof. Dr. med. W. Rummel danke ich für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung.

Herrn Dr. med. H. Büch bin ich sehr dankbar für die ständigen Anleitungen und die wertvolle Hilfe bei der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Am 12. November 1938 wurde ich als Sohn des Dr. med. Paul Texter und seiner Ehefrau Mathilde geb. Schemer in Neustadt a. d. Weinstraße geboren.

Von 1945 bis 1950 besuchte ich in Sulzbach/Saar die Katholische Volksschule.

Von 1950 bis 1954 war ich Schüler des Lycee Marechal Ney in Saarbrücken.

Von 1955 bis 1958 erlernte ich den Beruf eines technischen Zeichners.

Von 1959 bis 1961 besuchte ich das Saarland-Kolleg in Saarbrücken, wo ich im März 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1961 begann ich an der Universität des Saarlandes Medizin zu studieren. Das Vorphysikum legte ich im Sommersemester 1962 in Heidelberg ab. Nach Rückkehr an die hiesige Fakultät bestand ich im April 1964 das Physikum.

Nach 2 klinischen Semestern in Berlin kehrte ich nach Homburg/Saar zurück und bestand hier im Dezember 1967 das Medizinische Staatsexamen.

Von Januar bis April 1968 war ich als Medizinalassistent auf der Anästhesieabteilung des Evangelischen Krankenhauses Saarbrücken (Chefarzt Dr. med. Glenk) tätig. Z. Z. bin ich als Medizinalassistent in einer D-Arzt Praxis in St. Ingbert beschäftigt.